ARCHIVIO

PER LE

SCIENZE MEDICHE

PUBBLICATO DA

G. BIZZOZERO (Torino) — C. BOZZOLO (Torino) — P. FOÀ (Torino)
C. GIACOMINI (Torino) — C. GOLGI (Pavia) — L. GRIFFINI (Genova)
N. MANFREDI (Pisa) — E. MARCHIAFAVA (Roma) — A. MOSSO (Torino)
L. PAGLIANI (Torino) — E. PERRONCITO (Torino) — E. SERTOLI (Milano)
C. TARUFFI (Bologna) — G. TIZZONI (Bologna)

E DIRETTO DA

G. BIZZOZERO

Estratto



TORINO
CARLO CLAUSEN

1898.

ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE. — Vol. XXIII. N. 7.

Laboratorii della Sanità Pubblica
diretti dal Prof. B. Gosio

IL CONTROLLO DEL VACCINO

MEDIANTE LE INOCULAZIONI CORNEALI (1)

PER IL

Dott. **C. GORINI**

Valutando i vantaggi economici e tecnici che potevano derivare dall'impiego di animali di piccola taglia per il controllo del vaccino, e ricordando d'altra parte le note ricerche del Guarnieri (confermate poi da molti altri autori) (2) sopra l'infezione vaccinica provocata nella cornea di animali recettivi e segnatamente del coniglio, ho studiato se ed a quali condizioni fosse possibile, per lo scopo sopraddetto, ricorrere alle inoculazioni corneali nel coniglio, invece che alle inoculazioni cutanee sulle vitelle, come generalmente si pratica oggidì.

Furono adoperati da vari autori, e io stesso esperimentai anche altri animali di facile maneggio, come le cavie e i polli; ma si dimostrarono preferibili i conigli, perchè hanno occhi

(1) *NB.* In un lavoro, che è in corso di pubblicazione, saranno illustrate le mie ricerche sotto il riguardo puramente scientifico, come contributo alla questione dell'eziologia del vaccino.

(2) Bossalino, Clarke, Del Banco e Hückel, Ferroni e Massari, Kourloff, Monti, Pfeiffer L., Pfeiffer E., Salmon, Sicherer, Voigt, Wasielewski.

più grandi, più resistenti e più facilmente fissabili per le inoculazioni, e in fine più facilmente enucleabili per le indagini microscopiche.

Riguardo alla località di innesto, la cornea presenta sopra altre parti del corpo (cute, mucose) due grandi vantaggi: quello di essere maggiormente protetta e proteggibile dalle contaminazioni esterne (in tutte le numerose esperienze in bianco che ebbi occasione di eseguire, non mi è mai occorso un caso di inquinamento); e quello di non presentare troppo precoci focolaj di infiltrazione leucocitaria, cosicchè è reso possibile lo studio delle manifestazioni iniziali del processo patologico, prima che i punti di infezione siano invasi dalle cellule migranti. Giova a questo proposito ricordare le precauzioni che si debbono avere nel praticare le inoculazioni, giusta le norme dettate dallo stesso Guarnieri.

Con un piccolo ago lanceolato (ago da cataratta) molto tagliente e sterilizzato in acqua bollente, si pratica nelle parti centrali della cornea, *il più superficialmente possibile,* tenendo il piano della lancetta tangente alla curva corneale, una puntura in modo da sollevare un piccolissimo lembo di epitelio; nella specie di tasca cosiffatta si introduce nuovamente l'ago caricato del materiale da inoculare.

(Limitandosi a fare delle semplici punture con un ago ordinario, si corre rischio che l'aumentata secrezione lacrimale asporti il materiale d'innesto).

È bene incidere nelle parti centrali della cornea, cioè lontano dai vasi corneali, e non penetrare troppo profondamente nel connettivo corneale, allo scopo di ritardare l'afflusso dei leucociti; e di circoscrivere al possibile l'irritazione all'epitelio anteriore, non complicando così le lesioni di quest'ultimo.

Sono note le alterazioni macroscopiche e microscopiche che produce il vaccino *genuino* innestato nell'epitelio corneale anteriore.

Tralasciando i minuti particolari, per i quali mi riporto alla descrizione data dal Guarnieri, io reputo conveniente per il caso attuale, in base a quanto ho potuto verificare io stesso

nel corso delle mie esperienze, di riassumere come segue le suddette alterazioni in ciò che esse presentano di più caratteristico:

Alterazioni macroscopiche. — 24 ore dopo l'innesto: nel punto di innesto, osservasi ispessimento dell'epitelio che appare leggermente sollevato.

2.24 ore dopo l'innesto: prominenza più marcata.

3.24 ore dopo l'innesto: ulceretta con leggero opacamento della cornea circostante.

Caratteristica è l'assenza di qualunque fenomeno di reazione infiammatoria locale, nei primi tre giorni (se si eccettui il leggerissimo e limitatissimo opacamento corneale). — Bene spesso le suddette alterazioni sono così di lieve conto, che occorre armare l'occhio di lente ingrandente ed osservare molto attentamente.

Alterazioni microscopiche (1). — Talora già dopo 24 ore, ma di solito in un periodo di tempo fra 2.24 e 3.24 ore dall'innesto, nelle adiacenze della lesione di continuo, osservasi iperplasia dell'epitelio e la presenza di corpiccioli di varia forma, circondati per lo più da un alone chiaro, che stanno in numero di uno, due e talvolta più, entro quasi tutte le cellule dell'epitelio anteriore nella località corrispondente alla lesione, e bene spesso spingono da un lato o deprimono il nucleo di esse, deformandolo in varia guisa. Questi corpiccioli, difficilmente visibili allo stato fresco, non colorati, in causa della torbidezza e opacità del protoplasma cellulare, sono invece molto facili a ravvisarsi nei preparati colorati per la loro spiccata colorabilità.

Parecchi sono i processi indicati dagli autori per mettere in evidenza i corpiccioli endocellulari; molto semplice ed opportuno, pel caso nostro, mi è sembrato quello adottato da Guarnieri e da Ferroni e Massari, cioè fissazione delle

(1) Come dimostrerò nella seconda memoria, le alterazioni microscopiche dell'epitelio corneale non si limitano solamente ai noti corpiccioli endocellulari, ma questi però costituiscono il reperto più costante.

cornee in sublimato acido e colorazione in ematossilina Delafield.

Ecco il metodo che ho seguito per il controllo microscopico:

Appena ucciso il coniglio con un colpo sulla nuca, si escidono le cornee o, meglio, le porzioni di cornea dove esiste la lesione, badando a non imbrattarle di sangue, e le si immergono subito per mezz'ora nella seguente soluzione fissatrice:

Acqua distillata	gr.	100
Sublimato corrosivo	»	20
Cloruro sodico	»	3
Acido acetico	»	3

Poscia i pezzi vengono lavati ripetutamente in acqua stillata per mezz'ora, passati successivamente in alcool a 70° iodato per 24 ore, in alcool a 70° per 2 giorni, in ematossilina Delafield per 24 ore, in alcool a 70° acidulato con acido acetico per 24 ore, e da ultimo nella serie progressiva degli alcool per essere inclusi in paraffina e sezionati.

Questo processo richiede, come si vede, almeno otto giorni per la sua esecuzione.

Desiderando abbreviare il controllo microscopico, io ho trovato che si può farlo osservando direttamente a fresco dei brandelli di epitelio raschiati dalla superficie della cornea e dissociati in soluzione fisiologica di cloruro sodico, tinta con saffranina.

Con questo metodo, che si può chiamare del *raschiamento*, i corpiccioli endocellulari appariscono nettamente distinti, specialmente nelle cellule isolate e nei gruppi cellulari unistratificati e specialmente poi per chi ha già l'occhio abituato a vedere i detti corpiccioli nelle sezioni. Per cui, considerato il notevole risparmio di tempo che con esso metodo si raggiunge, io credo di poterlo consigliare in tutti i casi, ricorrendo al metodo delle sezioni soltanto per maggior garanzia, quando l'osservazione a fresco lasciasse qualche dubbio o riuscisse negativa.

Dopo essermi, per così dire, famigliarizzato, con ripetute prove colle suddette alterazioni, mi sono domandato se e come

esse potessero fornire criteri per giudicare la bontà di un vaccino.

I vaccini da me esperimentati sono 22; e gli animali inoculati sommano a 65, e quindi le cornee innestate a (65 × 2) 130, di cui 104 esaminate anche al microscopio.

Le qualità che noi dobbiamo controllare in un vaccino sono due: la purezza e l'efficacia.

Purezza. — Riguardo alla purezza, gli studî fondamentali eseguiti in questi ultimi anni nell'*Institut für Infections-Krankheiten* di Berlino, da una Commissione Ministeriale nominata *ad hoc* (1), e ripetuti poi nel *Kaiserliche Gesundheitsamt* di Berlino (2) e altrove (3), hanno valso a sedare gli allarmi suscitati da Landmann, Paul ed altri circa i pericoli della vaccinazione animale, ponendo in sodo i seguenti due fatti:

1° Che sebbene, con tutte le possibili cautele (impiego di semente sterile, inoculazione dorsale delle vitelle, uso di disinfettanti energici, ecc.) non si riesca ad ottenere vaccino animale privo e nemmeno povero di germi estranei, tuttavia nei vaccini *preparati colle dovute pratiche di pulizia e di asepsi* non si contengono bacteri patogeni (non esclusi i temuti streptococchi della risipola), o al più, e solo eccezionalmente, una tenue quantità di stafilococchi piogeni che, quantunque si dimostrino patogeni per gli animali da esperi-

---

(1) Frosch, l. c. La Commissione era composta dai professori Schmidtmann, R. Koch, R. Pfeiffer, Frosch, e da tre direttori di Istituti vaccinogeni, i dottori Freyer, Schulz e Vanselow. Essi esaminarono 82 campioni di vaccino provenienti dagli otto Istituti Vaccinogeni Prussiani.

(2) Deelemann, l. c. Esaminò 39 campioni di vaccini provenienti da tutti i Vaccinogeni della Germania, esclusi i Prussiani.

(3) Migula, Kirchner, Dreyer, Ascher e Symanski (l. c.) esaminarono rispettivamente il vaccino dei Vaccinogeni di Karlsruhe, di Hannover (18 campioni), di Darmstadt (28 campioni, appartenenti a due annate: 1896 e 1897) e di Königsberg.

mento, sono ben lungi dal possedere la virulenza di quelli che si riscontrano nei furuncoli, flemmoni e ascessi dell'uomo, cosicchè non v'è ragione di attribuir loro i fenomeni flogistici che complicano talvolta le vaccinazioni.

2° Che (come ha già dimostrato Leoni fin dal 1890) colla conservazione in glicerina, il vaccino si purifica dei germi estranei; e ciò in una misura e con una rapidità che sono proporzionali alla quantità e qualità dell'inquinazione, alla quantità di glicerina, e alla durata della sua azione, vale a dire all'età del vaccino.

Orbene, entrambi questi fatti io ho potuto confermare colle inoculazioni corneali.

Nelle mie esperienze mi sono quasi sempre valso di vaccini o che erano preparati da me stesso nei Laboratori della Sanità Pubblica o alla cui preparazione io avevo potuto tener dietro nell'Istituto Vaccinogeno del Municipio di Roma (1). — Soltanto sei vaccini sopra 22, mi pervennero già preparati.

Il sistema di preparazione, uguale in tutti i casi, non presentava niente di specialmente ricercato; esso era improntato alle più semplici norme di pulizia e di asepsi, che si compendiano nelle pratiche seguenti:

rasatura della superficie ventrale della vitella — lavaggio con acqua e sapone — lavaggio e disinfezione meccanica con acqua sterilizzata e batuffoli sterilizzati — innesto con semente conservata da diverso tempo in glicerina e strumenti sterilizzati — applicazione alla vitella di un grembiale pulito, da rimutarsi ogni giorno durante lo sviluppo delle pustole — lavaggio con acqua e batuffoli sterilizzati, prima della raccolta — raccolta per raschiamento (al 5°-7° giorno) — triturazione (in mortaio di porcellana) e setacciamento in recipiente

---

(1) Rendo sentite grazie per la cortese ospitalità e per la generosa concessione di materiale all'egregio dott. Leonardo Valentini, veterinario comunale, che con tanta competenza dirige il detto Istituto.

e con strumenti sterilizzati con aggiunta del 50 % circa di glicerina neutra Price sterilizzata, suddivisione in tubetti o in vasetti sterilizzati, ricolmi, chiusi e paraffinati, mantenuti al riparo dalla luce e in refrigerante alla temperatura dell'acqua Marcia corrente.

La suddivisione era fatta allo scopo di poter sempre adoperare un tubetto o vasetto di vaccino nuovo per ogni esperienza, conoscendosi l'influenza dannosa dei ripetuti contatti coll'aria esterna (Freyer).

Nell'esporre i risultati delle mie esperienze indico con:

normale l'alterazione macroscopica tipica prodotta dal vaccino genuino, come è stata descritta più sopra; in essa, ripeto, è caratteristica l'assenza di fenomeni di reazione infiammatoria locale *nei primi tre giorni*, se si eccettui un leggerissimo intorbidamento corneale circoscritto attorno all'ulceretta verso la fine del terzo giorno (3.24).

Questo fatto fu da me verificato costante, anche quando inoculavo vaccini presi direttamente dalla vitella, dal profondo delle pustole, vaccini cioè nella condizione di massima purezza, ma altresì di massima concentrazione e attività.

(Noto, per incidenza, che una simile prova non è mai stata fatta da nessuno dei precedenti esperimentatori).

Insisto però sulla circostanza dei *primi tre giorni*, giacchè, dopo questo tempo, almeno quattro o cinque giorni dall'innesto, anche con vaccini discretamente purificati, specialmente se l'incisione corneale è penetrata alquanto addentro nel connettivo corneale, si può avere un approfondamento dell'ulcerazione con formazione di lembetti necrotici, discreto e diffuso opacamento della cornea, arrossamento della congiuntiva e talvolta persino *ipopion* nella camera anteriore, come osservarono anche Guarnieri e Sicherer.

Parlo invece di *reazione* quando, *entro i primi tre giorni*, compaiono manifesti fenomeni infiammatori consistenti:

a) per la *reazione forte*, in cheratiti e congiuntiviti precoci (entro 24 ore) intense e durature, abbondante lagrimazione, cisposità, fotofobia e *ipopion* nella camera anteriore, talora anche panoftalmite;

b) per la *reazione mediocre*, *leggera e leggerissima*, in opacamenti corneali e iniezioni congiuntivali più o meno accentuate, che compaiono tardivamente (in seconda, terza giornata) o che svaniscono in 24-48 ore, e che non sono accompagnate da *ipopion*.

Coll'inoculazione corneale di culture pure di stafilococchi piogeni a diverso grado di virulenza (1) e di bacteri saprofiti, isolati dai vaccini stessi, ho potuto verificare che la *reazione forte* corrisponde a un dipresso all'alterazione causata dagli stafilococchi virulenti, quale è già stata descritta da Leber; mentre le *reazioni mediocri e leggere* si possono ascrivere o a piogeni attenuati, oppure a saprofiti.

Vogliasi però considerare che, per le inoculazioni corneali coi singoli bacteri, io mi sono messo nelle condizioni più sfavorevoli, valendomi di culture pure di 24-48 ore su agar a 37°; laonde è lecito inferire che, specialmente quando trattasi di piogeni attenuati o di saprofiti, perchè un vaccino dia un certo grado di reazione infiammatoria, bisognerà che ne contenga un numero ragguardevole, avuto riguardo alla minima quantità di materiale che si impiega nelle inoculazioni corneali.

A questo proposito, mi preme dire che, nelle mie esperienze, mi preoccupai, nei limiti del possibile, di inoculare sempre la medesima quantità di vaccino; giacchè, se ciò non ha importanza sulla produzione di fenomeni infiammatori quando si impieghi vaccino genuino (come ho potuto convincermi nelle prove fatte col materiale preso direttamente dal profondo delle pustole), l'acquista evidentemente quando si usano, come di solito, vaccini impuri. (Di ciò bisognerà tener conto, come vedremo, nel giudicare i vaccini a seconda della loro diluzione).

---

(1) La virulenza degli stafilococchi piogeni era assaggiata *sui conigli* coll'inoculazione sottocutanea di 1 c. c. di brodo-cultura di 24 ore a 37°. La morte dell'animale con reperto di stafilococchi negli organi segnava una forte virulenza; la sopravvivenza con arrossamento, infiltrazione e suppurazione locali, più o meno accentuate, indicava una attenuazione di diverso grado.

Ora, dalle mie esperienze risulta che con sei vaccini inoculati in 20 cornee o subito dopo la raccolta o dopo sole 24 ore dalla raccolta, e quindi assai ricchi di germi estranei (come potei rilevare dalle piatte in agar glicerinato), non si ebbe nessun caso di reazione forte, e soltanto otto di reazione mediocre; per lo più essi diedero reazione leggera o leggerissima e perfino quattro esiti affatto normali.

Reazione forte fu riscontrata soltanto in due casi:

1° in un vaccino di quattro giorni, che però in seguito mostrò di purificarsi abbastanza rapidamente (verso la quinta settimana);

2° in un vaccino, il quale mentre a sole 24 ore di età diede a divedere di essere fra i meno impuri (reazione leggera in tre occhi ed esito normale in un occhio), nei giorni successivi subì un notevole deterioramento per manifesto processo putrefattivo.

Tutto ciò sta dunque a comprovare la relativa purezza e segnatamente la rarità e scarsezza di piogeni virulenti nel vaccino preparato *lege artis*. E sta a provare altresì che quel grado di impurità, che possiamo chiamare inevitabile e quindi compatibile nel vaccino, non è tale da disturbare il decorso delle alterazioni vacciniche macroscopiche.

Riguardo al secondo fatto, cioè all'azione purificatrice della glicerina, essa risultò dall'intensità progressivamente decrescente dei fenomeni reattivi che si ottennero inoculando il medesimo vaccino a diversa distanza di tempo dalla raccolta. Questa prova venne ripetuta sopra nove vaccini; in uno solo riuscì, come già dissi sfavorevole; in tutti gli altri, e segnatamente in un vaccino che fu controllato undici volte (fra 24 ore e 160 giorni di età), l'azione depuratrice emerse colla massima evidenza. Questa depurazione in alcuni si manifestò con estrema rapidità (in un vaccino si può dire in 24 ore), in altri procedette con discreta lentezza, la purificazione completa non ritardò però mai al di là di 50-60 giorni. Ciò si

accorda colle osservazioni fatte da Leoni e nella maggioranza degli Istituti Vaccinogeni stranieri, che assegnano un termine variabile da 4 ad 8 settimane alla purificazione del vaccino preparato con una proporzione media di glicerina. La diversa celerità di purificazione, data l'eguale proporzione di glicerina e l'eguale metodo adoperato nella preparazione di tutti i miei vaccini, deve evidentemente ascriversi alla diversa quantità e qualità dei germi estranei contenuti nelle varie linfe.

Fra i più resistenti figurano gli stafilococchi piogeni (*aureus* e *albus*), i quali però si attenuano in breve tempo (in uno de' miei vaccini in 15 giorni; secondo Deelemann al più tardi in 30 giorni), dopo di che essi possono essere equiparati agli ordinari cocchi epifiti della cute (Bizzozero, Bordoni-Uffreduzzi, Maggiora). Ancora più tenaci mi risultarono i bacilli cosidetti della *xerosi* o *pseudo-difterici*, che trovai pressochè costanti e numerosi in tutti i vaccini, e che hanno caratteri morfologici e culturali simili a quelli del B. difterico; ultimi a scomparire sono, naturalmente, i bacteri sporigeni, appartenenti alle classi del bacillo *subtilis*, del bacillo delle patate, ecc. Fra i meno resistenti notai i bacilli *coli* e certi bacillini corti, che si possono chiamare pseudo-streptococchi perchè dànno colonie superficiali in agar glicerinato simili a quelle degli streptococchi, dai quali però si differenziano facilmente nelle culture in brodo, intorbidando questo uniformemente.

Questa è la flora microbica che riscontrai *prevalente* nelle culture allestite, secondo l'età del vaccino, con una o più anse di materiale disseminato su piatte di agar glicerinato tenute a 35-37°; restano così trascurate le specie microbiche che si sviluppano soltanto a bassa temperatura (volgari saprofiti dell'aria) e le anaerobie; tuttavia è degna di nota la uniformità della suddetta flora con quella osservata dagli altri Autori (e specialmente dalla Commissione Tedesca e da Deelemann) in vaccini di svariatissima provenienza (V. le note 1, 2, 3, a pag. 5); e sopratutto notevole è la esclusione degli streptococchi pio-

geni, contrariamente a quanto conducevano a pensare le conclusioni pessimiste di alcuni ricercatori, talchè era stato proposto di controllare il vaccino con inoculazioni sull'orecchio del coniglio per la prova della risipola (1).

Ma se tutti questi risultati confortanti valgono a sedare le nostre apprensioni circa la pericolosità del vaccino animale, e a moderare le nostre esigenze circa la sua purezza, non devono precluderci l'aspirazione ad una linfa animale il più possibilmente pura, nè esonerarci dalle cure e dalle responsabilità nella preparazione della linfa stessa, e tanto meno quindi rallentare la vigilanza delle autorità sanitarie sull'indirizzo tecnico degli Istituti Vaccinogeni, e sulla competenza di chi li dirige.

Su questo punto anzi si può affermare che i nuovi studi autorizzano ad essere sempre più rigorosi, imperocchè essi, mentre hanno ammesso inevitabile una certa inquinazione del vaccino, hanno altresì riconosciuto che essa proviene *esclusivamente dall'esterno*, dacchè le pustole giovani, non ancora rotte, sono per sè stesse sterili.

Anche questo fatto di capitale importanza per l'eziologia del vaccino, poichè sta a provare come la formazione delle pustole vacciniche sia indipendente dall'influenza di bacteri coltivabili, io ho potuto accertare colle inoculazioni corneali, prendendo la linfa *genuina* direttamente dalle pustole intatte della vitella, prima della raccolta.

Questa esperienza ebbi campo di ripeterla sopra sette vitelle, innestando 24 cornee. Orbene, tranne un caso di reazione infiammatoria leggera, in cui il materiale fu preso deliberatamente dalla superficie non lavata della pustola, per fare un confronto colla parte profonda della medesima, in tutti gli altri casi ebbi esito normale; aggiungasi che in quattro casi

---

(1) Pfeiffer L., *Zeitsch. f. Hyg.*, III, 1888, pag. 206. — Vedi anche Abba, l. c.

le pustole subirono in precedenza soltanto una semplice lavatura superficiale con acqua sterilizzata, e non un vero raschiamento, come negli altri casi, in cui mi interessava proprio di attingere il materiale d'innesto dalla parte profonda della pustola. Ora se si paragonano questi esiti normali colle reazioni più o meno pronunciate che si ottengono coi medesimi vaccini dopo la raccolta non si può a meno di ravvisare in ciò una conferma della sterilità originaria della linfa, sterilità che non è compromessa dal contenuto bacterico della semente (ricordo che io mi sono valso talora di sementi discretamente fresche, e quindi ancora molto inquinate). I germi estranei stanno dunque semplicemente alla superficie dell'epidermide e, insieme agli elementi di questa, entrano nella linfa quando la si raccoglie; essi possono anche penetrare in precedenza nell'interno delle pustole, quando queste si siano rotte.

Restano così additate una serie di precauzioni, le quali possono servire, se non ad impedire l'inquinazione, certo a ridurla al *minimum* possibile.

Già a questo intento si sono rivolti gli sforzi di Schulz, Paul e della Commissione Tedesca stessa e tutti ottennero i migliori risultati accoppiando un'accurata *toilette* della pelle con un'opportuna fasciatura protettrice.

Buone pratiche saranno pure quelle:

1° di seminare sulle parti della pelle meno provviste di peli (parte bassa della pancia);

2° di circoscrivere la seminagione a quel tratto di cute che può essere efficacemente protetta colla fasciatura o col bendaggio;

3° di fare incisioni lineari (anzichè a croce o di altra foggia), così da potere, nella raccolta, raschiare limitatamente le pustole risparmiando al possibile l'epidermide circostante;

4° di procedere alla raccolta prima che le pustole si rompano;

5° di ripulire e lavare accuratamente il campo di operazione, compresa la superficie delle pustole, prima della raccolta, ecc.

Non si parli poi dell'uso di strumenti e recipienti sterilizzati e dell'impiego di tutte quelle pratiche che sono oramai riconosciute necessarie per mettersi al riparo dalle contaminazioni esterne, e che dovranno essere sempre osservate in tutti i trattamenti della linfa.

Ma anche l'azione purificatrice della glicerina non è così illimitata e incondizionata da considerarla un rimedio infallibile in ogni caso, una salvaguardia contro ogni sorta di impurità e contro la trascuranza del preparatore. Essa pure è subordinata alla quantità e qualità dei germi inquinanti, alla proporzione della glicerina adoperata, alla temperatura di conservazione, alla suddivisione della linfa, alla esclusione dell'aria e ad altre circostanze non ben determinate.

Così si spiega come, a seconda dei casi, una medesima specie bacterica possa soccombere in termini di tempo molto diversi nella linfa conservata; per gli stafilococchi piogeni, ad es., Migula assegna una vitalità di non oltre tre settimane, Deelemann di un mese circa, Paul invece li trovò ancora attivi in una linfa di 4 mesi e Dreyer in una linfa di 7 mesi.

Così si spiega anche che, pur seguendo sempre il medesimo processo di preparazione, si abbiano talora, per un errore accidentale o per cause non bene afferrabili, a lamentare degli insuccessi. Ricordo a questo proposito, il caso di uno de' miei vaccini che andò incontro a putrefazione; ricordo pure che Deelemann, sopra 39 vaccini provenienti dagli Istituti Vaccinogeni Governativi di Germania, ne trovò uno che colla conservazione in glicerina si andò arricchendo anzichè impoverendo di germi.

Per tutti questi motivi, non mi sembra pratica accettabile quella di adottare una durata di conservazione costante per tutti i vaccini, ancorchè limitatamente ad ogni singolo Vaccinogeno, prima di licenziarli al servizio del pubblico, come si usa fare in molti Istituti di Germania.

Più ragionato invece appare il sistema di Paul, dell'Istituto

di Vienna, di sottoporre i vaccini ad un controllo bacteriologico, liberando al pubblico soltanto quelli che hanno raggiunto un dato grado di purezza (Paul assume come criterî di sufficiente purezza l'assenza di *st. aureus* e un contenuto bacterico di non oltre 50 germi per 0,01 grammo di linfa).

Ma anche qui vi sono troppo elementi di incertezza, sia che il controllo si fondi sul numero dei germi, sia che si fondi sulla qualità dei germi, nel quale ultimo casò bisognerebbe aggiungere anche la prova della virulenza dei bacteri trovati.

Infatti, riguardo al numero dei germi, basterà che io riferisca il caso pratico a me occorso di un vaccino contenente 33,333 germi per grammo che alle inoculazioni corneali rispose in modo del tutto normale, mentre un altro vaccino contenente soltanto 8,862 germi per grammo provocò un discreto grado di reazione infiammatoria.

Riguardo poi alla qualità dei germi, basterà ricordare che per l'appunto i cocchi piogeni, assunti da Paul come un indizio di insufficiente purezza, si mantengono a lungo nella glicerina, ma che altresì essi vi si attenuano fino a diventare del tutto innocui.

Sarebbe quindi ingiusto tanto lo scartare un vaccino perchè contiene un numero ragguardevole di germi banali, quanto lo scartarlo perchè contiene dei piogeni avirulenti.

Pertanto, riservando naturalmente all'esame bacterioscopico il còmpito di svelare, in casi speciali, l'esistenza di determinate inquinazioni, parmi che, in via ordinaria, un giudizio più decisivo, più largo, e insieme più spedito ci venga offerto dal controllo fisiologico, eseguito sulla cornea del coniglio, a preferenza di altro animale o di altra parte del corpo, per le ragioni esposte dapprincipio e per i vantaggi che più sotto farò rilevare.

Questo controllo (è bene tenerlo presente) verrebbe fatto non già per giudicare la nocevolezza del vaccino, sapendosi ormai che anche vaccini quantitativamente impuri possono riuscire del tutto innocui e sapendosi d'altra parte che la virulenza dei piogeni, come in generale di ogni germe patogeno, è

sempre subordinata alla specie animale sulla quale essa viene assaggiata, per cui non è lecito assorgere senz'altro dagli animali di esperimento all'uomo; sibbene il controllo fisiologico verrebbe eseguito per riscontrare se nella preparazione del vaccino vi furono inquinazioni anormali, eccezionali, e se la purificazione in glicerina procede regolarmente.

Per spiegarmi meglio, l'impurezza per tal modo constatata nel vaccino avrebbe un significato semplicemente indiziale, come lo hanno gli acidi nitroso e nitrico rispetto all'acqua potabile.

Ed anche sotto questo punto di vista, il giudizio può essere dato senza timore di riuscir troppo severi, giacchè, come ho già fatto notare, quel grado di impurità che possiamo chiamare inevitabile, e quindi compatibile, nel vaccino, per quanto fresco questo sia, o è del tutto senza influenza sul decorso delle alterazioni vacciniche, o, al più, le accompagna di qualche trascurabile fenomeno di reazione infiammatoria da parte della cornea o della congiuntiva.

Laonde, in base alle moderne cognizioni circa le impurità compatibili del vaccino ed in base alle mie esperienze, io non esiterei a dichiarare eccessivamente inquinato o malamente conservato (ripeto, non nocivo, nè pericoloso) un vaccino che, specialmente dopo un certo tempo, per quanto breve, di conservazione in glicerina, provocasse una reazione infiammatoria forte (con *ipopion* in 24-48 ore) oppure che dopo 7-8 settimane di conservazione non desse ancora esito normale tipico alle inoculazioni corneali.

Parimenti, volendo assicurare una linfa uniforme e priva di ogni sospetto, si potrebbe stabilire, negli Istituti Vaccinogeni, di adoperare soltanto vaccini che alle inoculazioni corneali rispondessero con esito normale.

Questi controlli acquistano naturalmente maggiore importanza e sicurezza quando vengano eseguiti sopra un certo numero di conigli (il che vedremo essere molto opportuno anche per provare l'efficacia della linfa).

Nelle mie esperienze ho notato infatti che non sempre le

cornee trattate col medesimo vaccino rispondono tutte egualmente; ciò può trovar spiegazione in una insufficiente omogeneità della linfa, causata da imperfetta triturazione del materiale raccolto, il che costituisce pure un difetto di preparazione; come anche può dipendere dalla diversa ampiezza e profondità della incisione corneale, dalla diversa quantità di vaccino innestato, nonchè dalle differenze individuali degli animali adoperati.

È bene però soggiungere subito che questi divarî sono di poco conto, sì che essi, mentre consigliano bensì di usare un certo numero di inoculazioni per ogni saggio, non possono influire sul giudizio circa la purezza dei vaccini.

Questo giudizio deve variare evidentemente a seconda dell'età del vaccino, ed anche a seconda della diluzione (proporzione di glicerina o d'altro menstruo del vaccino) per non correre rischio di esser troppo severi con linfe molto concentrate, o troppo indulgenti con linfe molto diluite.

Efficacia. — Per questa, mi accorsi ben presto, che non possono servire le lesioni macroscopiche della cornea innestata. Esse infatti non bastano evidentemente quando il vaccino è impuro, perchè si possono avere alterazioni troppo complesse. Ma non bastano nemmeno quando il vaccino è puro, perchè, come io ebbi occasione di verificare con esperienze *ad hoc*, l'alterazione macroscopica da esso prodotta è talora così insignificante e difficile ad afferrare ad occhio nudo od anche armato di lente d'ingrandimento, che non si distingue da quella che si ottiene coll'inoculazione di glicerina sterilizzata, o di vaccino inattivo, o di alcuni bacteri saprofiti, od anche colla semplice incisione della cornea con ago sterilizzato. Ciò ben si comprende quando si consideri che ogni qualvolta si produce una lesione della cornea, si effettua uno spostamento (e fors'anco una neoformazione) di cellule epiteliali, le quali, staccandosi dalle labbra della ferita, vanno a tappezzare ed a riempire la ferita stessa, cagionando quindi delle irregolarità, dei rilievi e degli avvallamenti, sulla superficie della

cornea (1), senza pensare alla possibilità di scollamenti epiteliali provocati dall'incisione, per cui si abbia la caduta di parte dell'epitelio anteriore, simulante un'ulcerazione.

Per valutare l'attività del vaccino, converrà adunque interrogare le alterazioni *microscopiche* dell'epitelio corneale anteriore, seguendo la tecnica che esposi dapprincipio.

Anche qui però, come a pròposito delle lesioni macroscopiche, bisogna vedere se le impurità del vaccino non producano alterazioni tali da disturbare o impedire il riscontro delle lesioni vacciniche.

Dalle mie esperienze risulta che, tranne in pochi casi di reazione infiammatoria molto forte, in cui si notava una estesa necrosi e caduta dell'epitelio, in tutti gli altri casi fu sempre possibile riscontrare i classici corpiccioli endocellulari. Soltanto ho osservato in due casi, in cui la reazione era un po' accentuata, che i corpiccioli erano più facilmente rintracciabili alla retrocessione dei fenomeni infiammatorî, ad es., al 4°-5° giorno; spesso però, anche in piena reazione, malgrado un discreto distacco di epitelio, si osservarono dei bellissimi e numerosi corpiccioli, vuoi ai margini del difetto, vuoi nei lembi epiteliali scollati. Pertanto a me parrebbe raccomandabile di inoculare tre conigli (cioè sei cornee) per ogni controllo, in modo da poter disporre, *in tutti i casi*, di cornee di 3 $\times$ 24 ore, che, normalmente, è il periodo di massima formazione dei corpiccioli; e, *nei casi di reazione*, anche di cornee appartenenti al periodo di remissione dell'infiammazione. Giova a questo proposito sapere che io ho potuto osservare i corpiccioli endocellulari anche in cornee di 8 giorni, e che Wasielewski li ravvisò ancora in cornee di 21 giorni.

---

(1) V. Ranvier, l. c. — e Schieck, l. c., il quale, ne' suoi studî sulla tubercolosi sperimentale della cornea de' conigli, fece pure esperienze colla semplice incisione corneale e coll'inoculazione di inchiostro di china.

Anche Bossalino ottenne, colla sola glicerina, delle « pustole corneali le quali, viste ad occhio nudo, potevano rassomigliare a quelle che comunemente si hanno in seguito alla inoculazione di pus vaccinico » (l. c., pag. 282).

Io invece non li trovai più in cornee di 18 giorni. Siccome poi, come abbiamo visto, sopra un certo numero di cornee trattate con un medesimo vaccino impuro, ve ne ha spesso qualcuna che reagisce con minore intensità delle altre, così, per abbreviare il còmpito diagnostico, è consigliabile di sottoporre, per le prime, all'esame microscopico quelle cornee in cui le lesioni macroscopiche apparvero meno gravi.

Seguendo queste norme, io sono riuscito sempre e agevolmente ad accertare l'attività anche in vaccini discretamente impuri. Che se poi un vaccino fosse tanto impuro da determinare in tutte le cornee innestate un forte ed esteso processo infiammatorio, rendendo impossibile il controllo microscopico, è superfluo preoccuparsi di accertarne l' efficacia, poichè siamo già autorizzati a scartarlo per soverchio inquinamento.

Convien notare da ultimo, che di quasi tutti i vaccini esperimentati, ho avuto campo, vuoi contemporaneamente alle inoculazioni corneali, vuoi in epoca posteriore, di constatare l'attecchimento sulle vitelle.

Resta ora a trattare la questione se il reperto microscopico del vaccino sia realmente caratteristico, cioè non possa essere dato nè andar confuso con quello dato da altri agenti. Una tale questione si impone dal momento che la scoperta di Guarnieri, pur essendo pienamente confermata da tutti gli esperimentatori, ha avuto ed ha tuttora una ben diversa interpretazione; secondo alcuni, i corpiccioli endocellulari dovrebbero riguardarsi quali parassiti specifici del vaccino, denominati perciò da Guarnieri *cytorictes vaccinae;* secondo altri, quali prodotti di una particolare alterazione cellulare che si può ottenere, sebbene in minor grado, anche irritando la cornea con agenti chimici (olio di croton, acido osmico).

Di fronte ad un simile disparere, non ancora appianato, ed anzi recentemente vieppiù complicato da una terza opinione che assegnerebbe ai corpiccioli un'origine leucocitaria (Salmon),

era ben naturale che io mi preoccupassi innanzitutto di accertarmi se una alterazione microscopica simile a quella sopradescritta fosse possibile di ottenere: *a*) colla sola glicerina, che è il menstruo più comune della linfa; *b*) coi principali bacteri che più frequentemente e più a lungo sono contenuti nel vaccino; *c*) col vaccino inattivo. Esperimentai pertanto:

a) con glicerina neutra Price, sterilizzata, sia pura (due conigli), sia diluita al $^1/_2$ (tre conigli) e ad $^1/_3$ (un coniglio);

b) con culture pure di stafilococchi saprofitici e piogeni attenuati (gli stafilococchi virulenti producono necrosi e caduta dell'epitelio e rendono quindi impossibile il reperto microscopico), di *B. coli*, di *B.* delle patate, di *B. subtilis*, del soprannominato pseudo-streptococco (un coniglio per ciascheduno) e del *B.* pseudo-difterico (due conigli) tutti isolati dai singoli vaccini;

c) quanto al vaccino inattivo, non fidandomi di adoperare linfa diventata inattiva spontaneamente, pensai di valermi di vaccino fresco, di constatata attività, di cui una parte fu resa inefficace mediante riscaldamento in bagno maria a 60° C. per un'ora (due conigli), e un'altra parte mediante filtrazione attraverso candela Chamberland, secondo le indicazioni di Schulz e Weyl (due conigli). L'inefficacia delle due porzioni di linfa, così trattate, fu controllata con abbondanti innesti sopra vitelle, le quali poi, inoculate con vaccino attivo, diedero esito positivo.

Orbene, con tutti questi materiali diversi, non ho mai osservato un'alterazione microscopica dell'epitelio corneale anteriore che potesse simulare quella ottenuta coi vaccini attivi; ottenni per verità, in alcune sezioni, qualche corpicciolo endocellulare, non distinguibile da alcune forme meno tipiche dei cosidetti *cytorictes*, ma così raro e solitario da non lasciar campo ad errori e nemmeno a semplici dubbi di diagnosi.

Intendo ritornare su questo punto nel prossimo lavoro puramente scientifico; per ora mi basta di dichiarare, per gli scopi pratici della presente relazione, che, in base alle lesioni microscopiche, qualunque sia la natura e il significato che si

voglia loro attribuire, noi possiamo giudicare l'efficacia di un vaccino.

Vantaggi. — Resta pertanto accertata la possibilità di controllare il vaccino colle inoculazioni corneali nel coniglio. Vediamo ora quali siano i vantaggi che questo mezzo presenta sopra quello, fin qui generalmente adottato, delle inoculazioni cutanee sulle vitelle.

I vantaggi economici e tecnici sono troppo evidenti per essere rilevati. Così pure è palese il vantaggio di poter controllare lo stato di purezza del vaccino; controllo che riesce molto difficile, per non dire impossibile, quando si esperimenta sulla cute delle vitelle, come di altri animali. Gli altri vantaggi si deducono facilmente dalle molteplici, notorie precauzioni che bisogna osservare negli Istituti Vaccinogeni, vuoi riguardo alla prevenzione degli inquinamenti esterni, vuoi alla scelta delle giovenche vaccinifere (età, razza, stato di salute, ecc.) (1), vuoi riguardo alla stagione opportuna dell'anno (inverno) (2), e più ancora dal fatto che, ad onta di tutte queste precauzioni, si hanno spesso a lamentare esiti spurii o completamente negativi, dovuti verosimilmente a che, malgrado si procuri di scegliere bovine molto giovani, se ne incontrano di quelle che hanno già sofferto vaccino spontaneo, per cui si dimostrano refrattarie ad una nuova infezione artificiale. Per tutte queste ragioni, il controllo sulle vaccine espone ad errori e ad incertezze di diagnosi, mentre le inoculazioni corneali nel coniglio, in base a quanto si può arguire dalle osservazioni dei numerosi Autori e mie, sono di riuscita certa e costante.

Per conto mio, devo anzi dichiarare che già mi occorse di aver per le mani vaccini che al controllo sulla vitella risposero deficientemente, in modo incerto, mentre alle inoculazioni corneali diedero esito nettamente positivo.

E, notisi, che per gli innesti corneali si impiegano porzioni

(1) Layet, l. c., p. 115.
(2) Paul, l. c., p. 169.

minime di linfa, ancora inferiori a quelle che si adoperano comunemente nelle vaccinazioni umane (1); per cui la prova dell'efficacia mediante le inoculazioni corneali riesce assai squisita e rigorosa, potendosi scoprire non soltanto l'assoluta inattività, ma anche una deficiente virulenza del vaccino, come può verificarsi vuoi per eccessiva diluzione (2), vuoi per soverchio invecchiamento, vuoi per altri difetti di preparazione e di conservazione. Questa scarsa attività potrà arguirsi qualora, sopra un certo numero di innesti, soltanto una parte riuscissero positivi (donde la importanza di adoperare più di un coniglio per ciascun controllo); e noi sappiamo infatti, che altra delle qualità del buon vaccino è quella di dare, nelle prime vaccinazioni, un numero di pustole corrispondenti al numero delle incisioni.

Un ultimo vantaggio si può realizzare, quando si faccia il controllo microscopico col metodo per raschiamento da me indicato (preparati a fresco in soluzione sodica con saffranina); il vantaggio cioè di accelerare di molto la diagnosi, potendosi dare il responso in tre giorni, mentre le inoculazioni cutanee sulle vitelle non permettono di pronunciare un giudizio prima di una settimana all'incirca.

Conclusioni. — In base a tutto quanto precede, parmi lecito concludere rispondendo come segue al tema propostomi:

Per il controllo del vaccino si può ricorrere *vantaggiosamente* alle inoculazioni corneali nel coniglio (3), osservando le seguenti condizioni principali:

---

(1) Si calcola che 1 c. c. di linfa glicerinata valga per 100 innesti. Frosch, p. 33.

(2) Secondo la Commissione Tedesca sembra che il grado massimo di diluzione per una linfa praticamente utilizzabile sia di 10 volte.

(3) Un accenno alla possibilità di impiegare le inoculazioni corneali per il controllo del vaccino lo troviamo nel seguente brano della memoria Monti, brano che mi piace riprodurre per intero, imperocchè esso viene a rincalzare le mie conclusioni:

« Applicando sistematicamente i nuovi criteri acquistati sulla natura

1° Inoculazione di tre conigli (sei cornee) per ogni controllo;

2° Incisioni accuratamente limitate e superficiali;

3° Osservazione quotidiana del processo macroscopico, continuata per i soli primi tre giorni (3.24 ore), per controllare la purezza della linfa;

4° Esame microscopico (in tutti i casi) di cornee di 3.24 ore e (nel caso di reazione) anche di cornee appartenenti al periodo di remissione dell'infiammazione, per controllare l'attività del vaccino.

Circa il controllo della purezza, è bene riassumere i risultati delle mie osservazioni, che si accordano con quanto si conosce circa il contenuto bacterico del vaccino, e circa l'azione purificatrice della glicerina:

I. Il vaccino genuino, cioè privo di germi estranei (contenuto nelle pustole illese), per quanto freschissimo, concentrato e non addizionato di glicerina, non dà, alle inoculazioni corneali, nessun fenomeno manifesto di reazione infiammatoria nei primi tre giorni.

II. Un vaccino preparato *lege artis* (cioè colle comuni norme di pulizia e di asepsi), sopratutto poi se ha già soggiornato qualche tempo, per quanto breve, in glicerina, come non contiene di regola bacteri piogeni virulenti, così non dà, alle inoculazioni corneali, gravi e persistenti fenomeni di

del vaccino, io ho potuto in seguito studiare la bontà delle diverse linfe preparate in vario modo e raccolte con diverse norme.

« Per mezzo delle inoculazioni corneali ho potuto riconoscere che il virus vaccinico si conserva bene in glicerina anche per lungo tempo, ma che perde gradatamente della sua virulenza; ho potuto infine confermare i risultati clinici del Violi il quale aveva trovato in generale più attive le pustole più giovani e in specie più efficace la parte profonda della pustola stessa.

« In realtà nella parte profonda della pustola si trova un numero minore di microbi estranei ed una quantità più grande di protozoi specifici.

« Solo i cattivi vaccini carichi di piogeni e di saprofiti dettero luogo a flemmoni corneali ».

infiammazione e segnatamente non dà *ipopion* nelle prime 3.24 ore dall'innesto; ma, al più, esso può provocare opacamenti corneali e iniezioni congiuntivali leggiere e di breve durata (24-48 ore).

III. Un vaccino preparato *lege artis*, dopo un certo periodo di conservazione in glicerina, dà sicuramente esito normale, cioè senza fenomeni infiammatori nei primi tre giorni, alle inoculazioni corneali. Questo periodo, quando il contenuto di glicerina è all'incirca del 50 $^0/_0$, può variare da 4 ad 8 settimane, che è appunto l'età ritenuta comunemente necessaria per la completa purificazione della linfa (1).

Circa il controllo dell'efficacia, i risultati principali delle mie ricerche possono essere così riassunti:

1° Nè il vaccino inattivo, nè la glicerina (che è il menstruo abituale del vaccino), nè i germi estranei che più comunemente si trovano nel vaccino, sono capaci di provocare un'alterazione microscopica dell'epitelio corneale anteriore, che possa essere scambiata con quella prodotta dal vaccino;

2° Le impurità abituali, inevitabili del vaccino preparato *lege artis* non sono in grado di impedire il riscontro delle lesioni microscopiche caratteristiche dell'infezione vaccinica della cornea (perlomeno, non in tutte le cornee innestate);

3° Per l'osservazione microscopica, si può, nella maggior parte dei casi, invece del metodo delle sezioni, ricorrere al metodo del raschiamento, rendendo così possibile di completare il controllo del vaccino in tre giorni.

Da tutto quanto precede emergono le seguenti considerazioni pratiche:

a) Che, volendo licenziare al pubblico un prodotto uni-

(1) Quanto alla durata della virulenza della linfa, è noto che essa varia entro limiti molto larghi, e cioè da pochi mesi fino a 2-3 anni. Colle inoculazioni corneali io accertai l'attività conservata in un vaccino di 14 mesi.

forme ed esente da ogni sospetto, una linfa, diremo così *normale ed efficace*, invece di fissare una età costante per tutti i vaccini, oppure di sottoporli ad un controllo bacteriologico, come si suole praticare attualmente negli Istituti Vaccinogeni, è consigliabile (salvo il caso di ricerche speciali), di attenersi al controllo fisiologico, mediante le inoculazioni corneali, stabilendo che, in via ordinaria, si adoperino soltanto vaccini che diano esito *normale* (macroscopico) e *positivo* (microscopico) sulle cornee dei conigli;

b) Che il giudizio sul grado di purezza di un vaccino deve essere subordinato all'età del vaccino stesso e al grado di diluzione del medesimo, per cui è necessario conoscere la data della raccolta e il modo di preparazione (specialmente riguardo alla proporzione di glicerina o altro menstruo impiegato) dei vaccini che si sottopongono a controllo.

Settembre 1898.

BIBLIOGRAFIA DEGLI AUTORI CITATI

Abba, *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica,* 1891, pag. 307.

Ascher und Smanski, *Zeitschr. f. Hygiene*, XXVIII, 1898, pag. 335.

Bizzozero, *Atti della Reale Accademia medica di Torino,* 1884.

Bordoni-Uffreduzzi, *Fortschr. d. Medic.*, 1886, pag. 151.

Bossalino, *Arch. per le Scienze med.*, 1898, pag. 273.

Clarke, *Centralbl. f. Bakter.*, 1895-XVII, pag. 300.

Deelemann, *Arbeiten a. d. kais. Gesund. Amte*, XIV, 1898, pag. 88.

Del Banco e Hückel, *Münch. med. Wochens* , 1897, n. 5, pag. 124.

Dreyer, *Zeitschr. f. Hygiene,* XXVII-1898, pag. 132.

Ferroni e Massari, *Riforma medica,* 1893-II, pag. 602 e *Bollettino dell'Accademia Gioenia di Catania,* 1895-XL.

Freyer, Bericht über die Sitzung der Herbstversammlung des Vereins der Aerzte des Regierungs-Bezirks Stettin, 8 novembre 1894, p. 17.

Frosch, « Zur Prüfung der Impstoff-frage ». Bericht über die Thätigkeit der von Ministerium eingesetzten Kommission. Berlin 1896. — Vedi anche la rivista critica del prof. Bizzozero sulla *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica*, 1897, pag. 194.

Guarnieri, 1ª Memoria, *Arch. per le Scienze med.*, 1892, pag. 403. — 2ª Memoria, *Atti del X Congresso Medico internaz. di Roma*, 1894, II, Sezione di patologia generale, pag. 125. — 3ª Memoria, *Clinica moderna*, 1897.

Kirchner, *Zeitschr. f. Hygiene*, XXIV-1897, pag. 530.

Kourloff, *Archives Russes de Pathologie,* etc., 1896, vol. II.

Landmann, *Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Aerzte*, 1895-II 2, e 1896-II 2.

Hygienische Rundschau, 1895, pag. 975 e 1896, pag. 441.

Layet, « Traité pratique de la vaccination animale ». Paris, 1889.

Leber, « Die Entstehung der Entzündung, etc. », Leipzig, 1891, Engelmann. — V. anche: Flügge, « Die Mikroorganismen, etc. », 3ª ediz. 1896, II vol., pag. 98.

Leoni, *Rivista d'Igiene e Sanità pubbl.*, 1890, pag. 328 e 1896, pag. 665

Maggiora, *Giornale della R. Società ital. d'Igiene*, XI, 1889, pag. 335.
Migula, *Arbeiten a. bakt. Institut zu Karlsruhe*, II B., 1898.
Monti, *Atti della Società Medico-Chirurgica di Pavia*, 1893. — *Atti del X Congresso Medico di Roma*, 1894, II, Sezione Patologia gen., pag. 128. — *Berlin. Klin. Wochensch.*, 1894.
Pfeiffer E. *Centralbl. f. Bakt.*, 1895-XVIII, pag. 769.
Pfeiffer L., « Die Protozoen als Krankheitserreger », Nachträge, Jena, 1895, pag 89. — V. anche: « Penzoldt's Handbuch der speziellen Therapie innerer Krankheiten », ed. 1897, pag. 203.
Paul, *Das Oesterreichische Sanitätswesen*, Beilage zu N. 43, 22 ottobre 1896.
Ranvier, *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 28 décembre 1896, CXXIII, pag. 1228.
Salmon, *Annales Pasteur*, 1897, pag. 289.
Schieck, *Ziegler's Beiträge zur Pat. Anat. etc.*, XX, 1896, pag. 247.
Schulz, D. *Vierteljahrs f. öff. Gesundheitspflege*, 1886, p. 276. — Vedi anche: Bordoni Uffreduzzi, *Rivista d'Igiene*, 1891, pag. 307.
Schulz und Weyl, *Zeitschr. f. Hygiene*, X, 1891, pag. 523.
Sicherer, *Münchener med. Wochensch.*, 1895, pag. 793.
Voigt, *Münch. med. Wochensch.*, 1897, n. 1, pag. 21.
Wasielewski, *Centralb. f. Bakter.*, 1897-XXI, pag. 901.

Consulta anche molto utilmente le relazioni annuali sulla attività degli Istituti Vaccinogeni dello Stato in Germania. - *Med. Stat. Mittheil. aus dem kais. Gesund. Amte*, dall'anno 1893 in poi.